

## ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛАСТОГЕННЫХ И АНЕУГЕННЫХ НАРУШЕНИЙ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Пашинская Е.С., Побяржин В.В.

УО "Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет"

**Введение.** Микроядра - это ядерные структуры, которые впервые были обнаружены в эритроцитах. Они имеют ядерное (хроматиновое) происхождение и представляют собой обычно небольшие образования округлой формы, окрашиваются в тон хроматина. Мелкие микроядра состоят из ацентрических фрагментов хромосом, что было продемонстрировано с помощью измерения содержания ДНК [3]. Средние и крупные микроядра могут быть образованы из цельной хромосомы в результате нерасхождения хромосом, вызванного дефектами веретена деления под влиянием веществ, влияющих на него. Применение микроядерного теста позволяет дифференцировать кластогенные (образование мелких микроядер из фрагментов хромосом) и анеугенные (образование средних и крупных микроядер из одиночных хромосом) нарушения в соматических клетках под воздействием негативных факторов окружающей среды [5].

Микроядерный тест использовался В.Я. Бекишем для определения мутагенного влияния метаболитов гелиминтов на соматические и генеративные клетки хозяина [1]. Было установлено, что *Trichinella spiralis*, *Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Hymenolepis nana* и их метаболиты обладают мутагенным воздействием на клетки костного мозга и семенников мышей самцов линии СВА. Однако до сих пор микроядерный тест не применяется при изучении кластогенных и анеугенных нарушений в эмбриональных клетках.

**Цель.** Разработать новые подходы и модифицировать метод микроядерного анализа для клеток эмбрионов.

**Материал и методы.** За основу исследования возможных кластогенных и анеугенных нарушений нами был взят метод микроядерного анализа, разработанный нами ранее [2]. Исследование проведено на 20 самках и 10 самцах белых беспородных мышей. Скрещивание проводилось в соотношении 2 самки к 1 самцу на протяжении 24 часов. Беременность самок определяли по наличию сперматозоидов в мазке из влагалища. Беременные самки были разделены на контрольную и опытную группы. Контрольной группе животных вводили внутривенно 0,2 мл крахмального геля, а подопытных самок заражали инвазионной культурой *T. spiralis* в дозе 20 личинок на 1 г массы тела животного в 1-ый день беременности. Далее животные содержались в условиях вивария в течение 14 дней. На 14 день всех самок мышей умерщвляли путем декапитации, выделяли матку с эмбрионами. От каждого животного брали по 2 жизнеспособных эмбриона и помещали в заранее пронумерованные чашки Петри. Образцы измельчали посредством гомогенизатора Поттера до получения однородной массы. К полученным суспензиям добавляли по 5 мл среды RPMI-1640 (pH=7,2) и переносили в первый ряд пробирок с V=10 мл соответственно нумерации для осажде-

ния крупных частиц. Далее верхний слой гомогенной массы без крупных фрагментов помещали во 2-й ряд пробирок соответственно нумерации и доводили объем до 5 мл с помощью среды RPMI-1640. Путем десятиминутного центрифугирования при 1100 об/мин и температуре 8 °C производили отмывку гомогената. После первой отмывки супернатант удаляли полностью, добавляли по 5 мл среды RPMI-1640 (pH=7,2) в каждую пробирку и ресуспензировали осадок. Далее проводили второе центрифугирование. После окончания 2-го центрифугирования оставляли в пробирке 0,5 мл полученной взвеси, которую тщательно перемешивали. Затем с помощью вариопипетки на пронумерованные предметные стекла наносили 20 мкл суспензии и делали мазок с использованием стекла со сточенным под углом краем. Препараты высушивали в стандартных условиях лаборатории.

Для фиксации препаратов использовали раствор Мая-Грюнвальда, полученного путем разведения 1 г сухого красителя эозинметиленового синего в 1000 мл этилового спирта. Сухие нефиксированные мазки помещали в кювету с раствором Мая-Грюнвальда на 2 минуты. После чего контейнер с мазками ополаскивали в кювете с дистиллированной водой в течение 1 минуты.

Окраску фиксированных микропрепаратов производили по Паппенгейму. Для этого готовили краситель для окраски мазков по Нохту путем растворения основного раствора азура II : 1 г в 1000 мл дистиллированной воды. Далее оставляли на 12 дней в посуде из темного стекла, после чего использовали. Основной раствор эозина калия готовили путем разведения 1 г краски в 1000 мл дистиллированной воды и хранили в течение 12 дней в посуде из темного стекла до готовности. Фосфатный буфер (смесь Вейзе) pH 7,4-7,5 получали посредством смешивания 0,49 г калия фосфата однозамещенного безводного ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) и 0,909 г натрия фосфата двузамещенного безводного ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) в 1000 мл дистиллированной воды [4]. Непосредственно перед окраской препаратов готовили рабочий раствор азур-эозина, смешивая 20 мл основного раствора азура II, 20 мл основного раствора эозина калия и 60 мл буферного раствора. Далее помещали контейнер с мазками в кювету с азур-эозиновой краской по Нохту на 5 минут. Затем полученные микропрепараты промывали в дистиллированной воде и высушивали в течение 24 часов при комнатной температуре.

**Результаты и обсуждение.** Полученные микропрепараты анализировали на микроскопе Leica DM 750 (при увеличении 1000 x). На каждом микропрепарате просчитывалось по 200 клеток с целыми оболочками на стадии интерфазы. Отмечалось хорошее окрашивание цитоплазмы клеток в светло-голубой цвет с темными ядрами в центре. Микроядра окрашивались в темно-синий цвет и располагались на периферии цитоплазмы или

около ядра. У животных опытной группы наблюдалось достоверное увеличение количество микроядеросодержащих клеток по сравнению с контрольной.

Таким образом, можно заключить, что метод определения микроядер в соматических клетках, предложенный В.Я. Бекишем и В.В. Побяржиным можно считать адаптированным для эмбриональных клеток.

#### **Выводы.**

Применение микроядерного теста для эмбриональных клеток будет способствовать установлению возможных кластогенного и анеугенного воздействий факторов среды на беременных самок и благоприятствовать разработке подходов к защите их генома.

#### **Литература:**

1. Бекиш В.Я. Состояние генома хозяина при гел-

минтозах / В.Я. Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш // - Витебск: Изд. ВГМУ. - 2004. - С. 40-43.

2. Бекиш, В.Я. Методика постановки микроядерного теста в семенниках мышей / В. Я. Бекиш, В. В. Побяржин // Фунд. науки и достижения клин. медицины и фармации: тез. докл. 58 науч. сессии ВГМУ. - Витебск, 2002. - С. 4-5.

3. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность / Н. Н. Ильинских [и др.]. - Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. - 272 с.

4. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / В. В. Меньшиков [и др.]; под ред. В. В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 368 с.

5. Yamamoto, K. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons / K. Yamamoto, Y. Kikuchi // Mutat. Res. - 1980. - Vol. 71. - P. 127-131.

## **СЕРДЦЕ - ЭНЕРГОИНФОРМАЦИОННЫЙ ОРГАНИЗАТОР КРОВОТОКА И СИНХРОНИЗАТОР ФУНКЦИЙ В ЖИВОТНОМ ОРГАНИЗМЕ. КАРДИАЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ИНТЕГРАЦИИ**

**Родионов Ю.Я.**

***УО "Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет"***

Сорок пять лет тому назад предложена гипотеза (Родионов Ю.Я., 1965). что транскапиллярный обмен (массоперенос) осуществляется в режиме биений сердца на фоне стационарного механизма, описанного в 1896 году Старлингом - "периферическая гипотеза Старлинга".

К. Видергельм и соавт. в 1964 году, применив оригинальный "серво-нулирующий микроманометр" установили, что кровяное давление пульсирует на всех уровнях системы микроциркуляции. На синхронные с биениями сердца колебания кровяного давления в микрососудах накладываются "спонтанные колебания" более высокой амплитуды, которые и являлись интересными для авторов изобретённого метода. Спонтанные колебания давления по их мнению отражают интенсивность метаболических событий, происходящих в периферических тканях, а сохранение пульсаций давления крови в микрососудах расценивалось авторами как отражение высокой разрешающей способности изобретённого ими микроманометра. Однако мы предположили, что это явление физиологически необходимо. Возникла идея о "биологически квантованном" процессе транскапиллярного обмена, который осуществляется на фоне стационарного механизма Старлинга и обеспечивает более гибкий и адекватный во времени и пространстве транскапиллярный массоперенос. Именно поэтому животные организмы могут достаточно быстро переходить на новые уровни функции с минимизацией "постоянной времени" метаболических и физиологических процессов в условиях покоя и физического напряжения. В дальнейшем, развивая эту идею с участием талантливого инженера и математика В.П. Чикова, были построены математические модели с аналоговым вычислительным моделированием на АВМ и получены теоретические доказательства справедливости предложенной гипотезы. Сде-

лан важнейший вывод о том, что сердце, задающее пульсирующий режим транскапиллярного обмена, является особым биологическим насосом-осциллятором.

В 1973 году, выступая в дискуссии на Международном симпозиуме по регуляции емкостных сосудов (2-5 октября 1973, Ленинград), я изложил идею о том, что транскапиллярный обмен имеет две составляющие - факультативную и облигатную. Облигатная составляющая - это сумма ультрафильтрационного и диффузионного пульсирующего (конвекционного) и стационарного (старлинговского) потоков из сосудов в ткань:

$$I_n = G,$$

где  $g_i$  - средняя величина потока;  $\omega$  - частота пульсаций,  $l$  - текущая координата вдоль оси капилляра,  $t$  - время. Факультативная составляющая - это в значительной мере селективный (регуляторный) трансэндотелиальный транспорт веществ, который преимущественно осуществляется на веноулярном уровне системы микроциркуляции. Было специально подчеркнуто, что пульсирующий характер транскапиллярного обмена, задающийся сердцем, позволяет рассматривать сердце как особый биологический насос-осциллятор. Эти идеи получили поддержку в беседе с крупнейшими специалистами-физиологами Полом Джонсоном (Аризонский университет), Джоном Шефердом (Клиника Мэйо, США), Бьерном Фольковым (Каролинский университет, Швеция) и с выдающимся советским патофизиологом академиком АМН СССР и вице-президентом АМН СССР А.М. Чернухом. По предложению А.М. Чернуха мы с В.П. Чиковым в феврале 1974 года сделали специальное сообщение о результатах наших исследований на заседании Президиума Академии медицинских наук СССР. В дальнейшем, результаты разработки этой проблемы были опубликованы в 30 научных сообщениях (на рес-